



TITLE:

癌細胞由来エキソソームを利用した癌抗原デリバリーシステムに基づく癌免疫療法の開発に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

森下, 将輝

CITATION:

森下, 将輝. 癌細胞由来エキソソームを利用した癌抗原デリバリーシステムに基づく癌免疫療法の開発に関する研究. 京都大学, 2017, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20319>

RIGHT:

許諾条件により本文は2019-03-31に公開; 1. Author can archive pre and post-print after embargo period of 12 months. 2. Author cannot archive publisher's version/PDF. 3. Author must link to publisher version with DOI.

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	森下 将輝
論文題目	癌細胞由来エキソソームを利用した癌抗原デリバリーシステムに基づく癌免疫療法の開発に関する研究		
<p>エキソソームは、細胞が分泌する直径約100 nmの脂質二重膜から成る小胞であり、その産生細胞に由来したタンパク質や核酸を内包する。癌細胞が分泌するエキソソームは内因性の癌抗原を内包することから、これを利用することで癌抗原特異的な抗腫瘍免疫の誘導が期待できる。癌細胞由来エキソソームを利用した癌免疫療法の実現には、抗原提示細胞である樹状細胞（DC）への効率的な癌抗原デリバリーと、その後のDC上のMHCクラスI分子を介した癌抗原の提示が必要である。しかしながら、DCへのデリバリー方法の開発に際して重要となる、体外から投与された癌細胞由来エキソソームの体内動態に関する情報は乏しく、また癌細胞由来エキソソームを取り込んだDCの活性化および癌抗原の提示に関する検討も不十分であった。そこで申請者は、癌細胞由来エキソソームを基盤とした癌免疫療法の開発を目的として、癌細胞由来エキソソームの定量的な体内動態解析を行うとともに、効率的なDCの活性化と癌抗原の提示を可能とする遺伝子改変癌細胞由来エキソソームを開発し、抗腫瘍免疫の増強を試みた。</p>			
<p>第一章 癌細胞由来エキソソームの定量的体内動態解析を目的とした放射標識法の開発</p> <p>高感度で安定性に優れる放射性同位体を用いる方法は定量的な体内動態解析のための有用な手段であるが、これまでエキソソームに応用した報告例はない。そこで申請者は、遺伝子改変技術を応用したエキソソームへの新規放射標識法を開発し、癌細胞由来エキソソームの定量的な体内動態解析を試みた。エキソソームの放射標識には、ストレプトアビジン（SAV）とビオチン（biotin）間の結合を利用した。すなわち、SAVとエキソソーム移行性タンパク質であるlactadherin（LA）との融合タンパク質（SAV-LA）を設計し、これを発現するプラスミドDNAを構築した。マウスメラノーマ細胞株B16BL6に対しSAV-LA 発現プラスミドDNAを導入し、培養上清中に分泌されたSAV-LA修飾エキソソームを回収した。次に、SAV-LA修飾エキソソームをヨウ素125標識biotin誘導体の（3-¹²⁵I-iodobenzoyl）norbiotinamideと反応させることでエキソソームを放射標識した。放射標識エキソソームのマウス尾静脈内投与後の体内動態を放射活性を指標に評価した結果、癌細胞由来エキソソームは約2分の半減期で血中から速やかに消失した。また、投与4時間後の時点で投与量の約28、2、7 %がそれぞれ肝臓、脾臓、肺で検出された。以上より、エキソソーム放射標識法の開発に成功し、癌細胞由来エキソソームが血中から速やかに消失し、主に肝臓に取り込まれることを見出した。</p>			
<p>第二章 遺伝子改変癌細胞由来エキソソームを基盤とする癌抗原 - アジュバント同時デリバリーシステムの開発</p> <p>内因性癌抗原を内包する癌細胞由来エキソソームによる抗腫瘍免疫の誘導には、エキソソームを取り込んだ抗原提示細胞である樹状細胞（DC）の効率的な活性化と癌抗原の提示</p>			

が必要である。申請者は、遺伝子改変癌細胞由来エキソソームを免疫賦活剤（アジュバント）で修飾することで、癌細胞由来エキソソームを利用した癌抗原とアジュバントの同時デリバリーシステムの開発を試みた。第一章と同様にSAV-biotin結合を利用することとし、SAV-LA修飾したB16BL6細胞由来エキソソームに対し、免疫刺激性核酸であるCpG DNAのbiotin誘導体を修飾した。CpG DNA修飾エキソソームを用いることで、マウス樹状細胞株DC2.4の活性化および癌抗原提示能の有意な増大が認められた。また、B16BL6細胞担癌モデルマウスを用いた検討から、エキソソームとCpG DNAの単純混合物を投与した場合と比較して、CpG DNA修飾エキソソームを投与することで優れた腫瘍増殖抑制効果が得られた。以上、遺伝子改変癌細胞由来エキソソームを利用した癌抗原 - アジュバント同時デリバリーシステムの開発に成功し、癌免疫療法に有用であることを明らかにした。

第三章 細胞内動態制御型癌細胞由来エキソソームの開発による癌抗原提示能の増強

エキソソームはDCに取り込まれた後、細胞内小器官のエンドソームに輸送される。従って、癌細胞由来エキソソームを利用した効果的な抗腫瘍免疫の誘導には、エンドソームからの効率的な脱出を図り、細胞質へエキソソームをデリバリーすることで癌抗原のMHCクラスI提示能を増強させる必要がある。そこで申請者は、DCに取り込まれた癌細胞由来エキソソームの細胞内動態制御を試みた。エンドソームから細胞質への移行を促進するpH依存性の機能分子としてGALAペプチドを選択し、SAV-biotin結合を利用して、SAV-LA修飾B16BL6細胞由来エキソソームに対しGALAペプチドのbiotin誘導体を修飾した。エキソソーム内包物を蛍光標識し、これをDC2.4細胞へ添加したところ、GALA修飾エキソソームにおいて細胞質全体へのエキソソーム内包物の分布が観察された。また、DC2.4細胞にGALA修飾エキソソームを添加した際の癌抗原のMHCクラスI提示能は、GALAを有しないエキソソームの場合と比較して有意に高かった。以上、エンドソーム脱出ペプチドの利用により癌細胞由来エキソソームを積極的に細胞質へデリバリーすることで、癌抗原のMHCクラスI提示能を増強することに成功した。

以上、申請者は、エキソソームの放射標識法を開発し、癌細胞由来エキソソームの定量的体内動態解析に成功した。また、優れた抗腫瘍免疫の獲得には遺伝子改変癌細胞由来エキソソームを用いた癌抗原-アジュバントの同時デリバリーが有効であることを見出すとともに、エンドソーム脱出能を有する癌細胞由来エキソソームを開発することで効率的な癌抗原の提示を可能とした。本研究で得られた知見は、癌細胞由来エキソソームを利用した癌免疫療法の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

エクソソームは、細胞が分泌する直径約100 nmの脂質二重膜から成る小胞であり、その産生細胞に由来したタンパク質や核酸を内包する。癌細胞が分泌するエクソソームは内因性の癌抗原を内包することから、これを利用することで癌抗原特異的な抗腫瘍免疫の誘導が期待できる。癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の実現には、抗原提示細胞である樹状細胞(DC)への効率的な癌抗原デリバリーと、その後のDC上のMHCクラスI分子を介した癌抗原の提示が必要である。しかしながら、DCへのデリバリー方法の開発に際して重要となる、体外から投与された癌細胞由来エクソソームの体内動態に関する情報は乏しく、また癌細胞由来エクソソームを取り込んだDCの活性化および癌抗原の提示に関する検討も不十分であった。そこで申請者は、癌細胞由来エクソソームを基盤とした癌免疫療法の開発を目的として、癌細胞由来エクソソームの定量的な体内動態解析を行うとともに、効率的なDCの活性化と癌抗原の提示を可能とする遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを開発し、抗腫瘍免疫の増強を試みた。その結果、以下の新知見を得た。

まず、エクソソームの放射標識法を開発し、癌細胞由来エクソソームの定量的体内動態解析に成功した。また、優れた抗腫瘍免疫の獲得には遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを用いた癌抗原-アジュバントの同時デリバリーが有効であることを見出すとともに、エンドソーム脱出能を有する癌細胞由来エクソソームを開発することで効率的な癌抗原の提示を可能とした。本研究で得られた知見は、癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、平成31年3月31日まで当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。